

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 15 日 (15.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/084697 A1

(51) 国際特許分類: A61K 38/17, 48/00, 38/28,
31/4353, A61P 3/04, 43/00, 3/10, 9/10

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003744

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 4 日 (04.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
60/549,561 2004 年 3 月 4 日 (04.03.2004) US

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 門脇 孝 (KADOWAKI, Takashi) [JP/JP]; 〒
1130034 東京都文京区湯島 4-8-8-2 O 3 Tokyo
(JP). 山内 敏正 (YAMAUCHI, Toshimasa) [JP/JP]; 〒
1130024 東京都文京区西片 2-1 7-3 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル
6 階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,

BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REGULATOR FOR ADIPONECTIN RECEPTOR EXPRESSION

(54) 発明の名称: アディポネクチン受容体発現制御剤

(57) Abstract: By using mice under fasting and re-feeding, it is clarified that AdipoR1/R2 are regulatory factors for the metabolic sensitivity to nutritional state and insulin. AdipoR1/R2 mRNA levels are reinforced by the STZ treatment and the reinforcement is recovered by insulin. It is confirmed *in vitro* that insulin causes a decrease in AdipoR1/R2 mRNAs in myocytes, etc. It is also confirmed that, in an insulin resistance model, AdipoR1/R2 expression is regulated downward and AMP kinase activation by adiponectin is lowered. By using an insulin signal pathway inhibitor, it is found out that the downward regulation of adiponectin receptor by insulin is mediated by the PI3-kinase/Foxo1 pathway.

(57) 要約: 絶食および再摂食下マウスを用い、AdipoR1/R2 が栄養状態およびインスリンに対する代謝感受性の制御因子であることを明らかにした。STZ 処理による AdipoR1/R2 mRNA レベル増強、および、該増強のインスリンによる回復を示した。インスリンが筋細胞中等の AdipoR1/R2 mRNA を減少させることを、*in vitro* で確認した。インスリン抵抗性モデルでは AdipoR1/R2 発現が下方制御されていること、アディポネクチンによる AMP キナーゼ活性化が減少しているを確認した。インスリンシグナル経路阻害剤を用い、インスリンによるアディポネクチン受容体下方制御は、PI3-キナーゼ/Foxo1 経路を介していることを発見した。

WO 2005/084697 A1

明 細 書

アディポネクチン受容体発現制御剤

技術分野

[0001] 本発明は、アディポネクチン受容体の発現制御を利用したインスリン抵抗性および糖尿病の治療に関する。

背景技術

[0002] アディポネクチン/Acrp30(非特許文献1-4)は肥満細胞から分泌されるホルモンで、抗糖尿病(非特許文献5-12)かつ抗アテローム生成(非特許文献8,12,13)アディポカインとしての作用を有する。アディポネクチンは、5'-AMP-活性化プロテインキナーゼ(AMPK)(非特許文献10,11)およびペルオキシゾーム増殖因子-活性化受容体(PPAR) α (非特許文献5,6,12)の活性化を介した脂肪酸酸化増強によりインスリン感受性を亢進させると考えられる。最近本発明者らは、アディポネクチン受容体1(AdipoR1)および2(AdipoR2)をコードするcDNAのクローニングに成功した(特許文献1、非特許文献14)。AdipoR1は骨格筋に豊富に発現し、一方、AdipoR2は主に肝臓に発現する。AdipoR1およびR2は7つの膜貫通ドメインを有すると予想されているが(非特許文献14)、構造的および機能的にG-タンパク質共役受容体とは異なるとされている(非特許文献15-17)。AdipoR1およびR2はglobularアディポネクチンおよび全長アディポネクチンに対する受容体として機能し、AMPK(非特許文献10,11)、PPAR α リガンド活性(非特許文献12)、アディポネクチンによる脂肪酸酸化およびグルコース取り込みの増強を仲介する(非特許文献14)。

[0003] このようにAdipoR1およびAdipoR 2に関する知見が得られつつあるが、その生理学および病態生理学状態下においてAdipoR1およびR2の発現が変化するかどうかは、これまで知られていなかった。

[0004] 特許文献1:国際出願番号:PCT/JP2003/007515、国際公開番号:WO2004/061108、Patent number: US2004241802

非特許文献1:Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995) J. Biol. Chem. 270, 26746-26749

非特許文献2:Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B.M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 10697–10703

非特許文献3:Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., and Matsubara, K. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221, 286–296

非特許文献4:Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N.H., Mazda, T., and Tomita, M. (1996) *J. Biochem. (Tokyo)* 120, 802–812

非特許文献5:Fruebis, J., Tsao, T.S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R., Yen, F.T., Bihain, B.E., and Lodish, H.F. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 2005–2010

非特許文献6:Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M.L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P., and Kadowaki, T. (2001) *Nat. Med.* 7, 941–946

非特許文献7:Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., Brownlee, M., and Scherer, P.E. (2001) *Nat. Med.* 7, 947–953

非特許文献8:Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., Yano, W., Froguel, P., Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T., and Noda, T. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 25863–25866

非特許文献9:Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K., Horie, M., Takeda, S., Aoyama, T., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. (2002) *Nat. Med.* 8, 731–737

非特許文献10:Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B.B., and Kadowaki, T. (2002) *Nat. Med.* 8, 1288–1295

非特許文献11:Tomas, E., Tsao, T.S., Saha, A.K., Murrey, H.E., Zhang, Cc. C., Itani, S.I., Lodish, H.F., and Ruderman, N.B. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 16309-16313

非特許文献12:Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Imai, Y., Shimozawa, N., Hioki, K., Uchida, S., Ito, Y., Takakuwa, K., Matsui, J., Takata, M., Eto, K., Terauchi, Y., Komeda, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohnishi, Y., Naitoh, T., Yamamura, K., Ueyama, Y., Froguel, P., Kimura, S., Nagai, R., and Kadowaki, T. (2003) J. Biol. Chem. 278, 2461-2468

非特許文献13:Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Nishida, M., Matsuyama, A., Okamoto, Y., Ishigami, M., Kuriyama, H., Kishida, K., Nishizawa, H., Hotta, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Yamashita, S., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. (2001) Circulation 103, 1057-1063

非特許文献14:Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N.H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., and Kadowaki, T. (2003) Nature 423, 762-769

非特許文献15:Wess, J. (1997) FASEB. J. 11, 346-354

非特許文献16:Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takawa, Y., and Shimizu, T. (1997) Nature 387, 620-624

非特許文献17:Scheer, A., Fanelli, F., Costa, T., De Benedetti, P. G., and Cotecchia, S. (1996) EMBO. J. 15, 3566-3578

非特許文献18:Rakieten, N., Rakieten, M.I., and Nadkarni, M.V. (1963) Cancer Chemother. Rep. 29, 91-98

非特許文献19:Yamauchi, T., Waki, H., Kamon, J., Murakami, K., Motojima, K., Komeda, K., Miki, H., Kubota, N., Terauchi, Y., Tsuchida, A., Tsuboyama-Kasaoka, N., Yamauchi, N., Ide, T., Hori, W., Kato, S., Fukayama, M., Akanuma, Y., Ezaki, O., Itai, A., Nagai, R., Kimura, S., Tobe, K., Kagechika, H.,

Shudo, K., and Kadowaki, T. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 1001–1013

非特許文献20:Seglen, PO. (1976) *Methods Cell. Biol.* 13, 29–83

非特許文献21:Nakae, J., Park, B.-C., and Accili, D. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 15982–15985

非特許文献22:Nakae, J., Kitamura, T., Siliver, DL., and Accili, D. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 1359–1367

非特許文献23:Levine, BS., Henry, MC., Port, CD., and Rosen, E. (1980) *Drug. Chem. Toxicol.* 3, 201–212

非特許文献24:Herzig, S., Long, F., Jhala, US., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B., and Montminy, M. *Nature* (2001) 13, 179–83.

非特許文献25:Friedman, JE., Sun, Y., Ishizuka, T., Farrell, CJ., McCormack, SE., Herron, LM., Hakimi, P., Lechner, P., and Yun, JS. *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 31475–31481

非特許文献26:Shepherd, P. R., Withers, D. J., and Siddle, K. *Biochem. J.* (1998) 333, 471–490

非特許文献27:Kadowaki, T. *J. Clin. Invest.* (2000) 106, 459–465.

非特許文献28:Virkamaki, A., Ueki, K., and Kahn, CR. *J. Clin. Invest.* (1999) 103, 931–943

非特許文献29:Guo, S., Rena, G., Cichy, S., He, X., Cohen, P., and Unterman, T. *J. Biol. Chem.* (1999) 274, 17184–17192

非特許文献30:Biggs, W. H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W. K., and Arden, K. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1999) 96, 7421–7426

非特許文献31:Takaishi, H., Konishi, H., Matsuzaki, H., Ono, Y., Shirai, Y., Saito, N., Kitamura, T., Ogawa, W., Kasuga, M., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1999) 96, 11836–11841

非特許文献32:Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. *Cell* (1999) 96,

857-868

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明の課題は、第一には、アディポネクチン受容体(AdipoR1およびAdipoR2)の生理的および病態生理的機能を解明することである。第二には、該機能に基づき、アディポネクチン受容体を糖尿病治療に応用する手段を見出すことである。

課題を解決するための手段

- [0006] これらの問いに答えるべく、本発明者らは、まず絶食／再摂食(refeeding)状況下でのAdipoR1およびAdipoR2の発現およびインスリンレベルを、マウスを用いて検討した。絶食および再摂食によって、マウスAdipoR1/R2の発現は、劇的に変化した。また該AdipoR1/R2発現の変化は、in vivoにおける血漿インスリンレベルと逆の相関関係にあることが示唆され、AdipoR1/R2が栄養状態およびインスリンに対する代謝感受性の重要な制御因子である可能性が示された。
- [0007] 次に、streptozotocin(STZ)処理によりインスリンを欠乏させたモデル(非特許文献18)におけるAdipoR1/R2の発現を解析した。STZ処理によって、マウスの肝臓、骨格筋、脂肪組織のAdipoR1/R2 mRNAレベルは顕著に増強され、かつ、この増強はインスリン投与により回復されることが明らかになった。また、インスリンが筋細胞および肝細胞中のAdipoR1/R2 mRNAを減少させることを、in vitroの系で確認した。
- [0008] 肥満関連インスリン抵抗性による高インスリン血症モデル(ob/obマウス)を用い、そのAdipoR1/R2の発現を解析したところ、ob/obマウスでは、筋肉および脂肪組織において、AdipoR1/R2発現が著しく低下していることが示された。また、アディポネクチンと上記組織の膜分画との結合性を調べたところ、ob/obマウスでは、野生型マウスよりも顕著な結合量の減少がみられ、さらに、ob/obマウスの上記組織中では、アディポネクチンによるAMPキナーゼ活性化の減少が観察された。
- [0009] 上述の結果から、インスリンがアディポネクチン受容体の発現レベルやアディポネクチン感受性を負に制御し、肥満関連インスリン抵抗性／高インスリン血症がアディポネクチン受容体下方制御やアディポネクチン抵抗性を引き起こすことが明らかになった。

- [0010] さらに本発明者らは、インスリンによるAdipoR1/R2遺伝子発現減少メカニズムについても解析を試みた。興味深いことに、PI3-キナーゼインヒビターのLY294002は、インスリンによるAdipoR1/R2 mRNAレベル減少効果を打ち消すが、逆に、mitogen-activated proteinキナーゼ活性化インヒビターであるPD98059は、インスリンによる上記効果に対し影響を与えないという結果が得られた。インスリンによるアディポネクチン受容体下方制御は、PI3-キナーゼシグナル経路を介していることが示唆された。
- [0011] また本発明者らは、インスリンによるアディポネクチン受容体発現制御に関し、PI3-キナーゼ下流についても検討を試みた。PI3-キナーゼ下流エフェクターのAktが、フォークヘッドファミリーの転写活性化因子をリン酸化し、リン酸化された該転写活性化因子は結果的に転写活性が阻害されるとの知見が得られている。一方、AdipoR1/R2は、プロモーター中にフォークヘッドファミリー転写活性化因子であるFoxoIと結合可能なエレメント含んでいる。そこで、マウス由来のFoxoI(野生型、常時活性型)をC2C12細胞株にトランスフェクトし、さらに該細胞株をインスリン処理してAdipoR1/R2の発現を観察した。その結果、FoxoIはAdipoR1/R2の発現を増強し、インスリンはFoxoI不活性化を通じてアディポネクチン受容体発現を下方制御していることが示された。
- [0012] 結論として、本発明者らによって、インスリン標的組織でのAdipoR1/R2発現は、血漿インスリンレベルと逆相関関係にあること、インスリンがPI3-キナーゼ/FoxoI経路を介してアディポネクチン受容体の発現レベルを負に調節していることが、初めて明らかにされた。インスリン抵抗性やII型糖尿病の治療として、AdipoR1/R2アゴニストのみならず、AdipoR1/R2を増加させる戦略が有効であることが初めて示された。すなわち、本発明はAdipoR1/R2の制御による糖尿病治療薬に関し、より具体的には、下記に示す発明である。
- (1) FoxoIタンパク質またはFoxoI遺伝子を含むアディポネクチン受容体発現促進剤、
 - (2) FoxoIタンパク質またはFoxoI遺伝子を有効成分として含有するアディポネクチン抵抗性改善剤、
 - (3) FoxoIタンパク質またはFoxoI遺伝子を有効成分として含有するインスリン抵抗性

改善剤、

(4) FoxoIタンパク質またはFoxoI遺伝子を有効成分として含有する肥満症予防または改善剤、

(5) FoxoIタンパク質またはFoxoI遺伝子を有効成分として含有する糖尿病予防または治療薬、

(6) FoxoIタンパク質またはFoxoI遺伝子を有効成分として含有する動脈硬化症の予防または治療薬、

(7) PI3キナーゼ-Akt経路阻害剤を含む、アディポネクチン受容体発現促進剤、

(8) PI3キナーゼ-Akt経路阻害剤が、PI3 (Phosphoinositide 3) キナーゼ阻害剤である、上記(7)記載のアディポネクチン受容体発現促進剤、

(9) PI3 (Phosphoinositide 3) キナーゼ阻害剤がLY294002である、上記(8)記載のアディポネクチン受容体発現促進剤、

(10) 上記(7)から上記(9)のいずれかに記載のアディポネクチン受容体発現促進剤を有効成分として含有するアディポネクチン抵抗性改善剤、

(11) 上記(7)から上記(9)のいずれかに記載のアディポネクチン受容体発現促進剤を有効成分として含有するインスリン抵抗性改善剤。

(12) 上記(7)から上記(9)のいずれかに記載のアディポネクチン受容体発現促進剤を有効成分として含有する肥満症予防または改善剤、

(13) 上記(7)から上記(9)のいずれかに記載のアディポネクチン受容体発現促進剤を有効成分として含有する糖尿病予防または治療薬、

(14) 上記(7)から上記(9)のいずれかに記載のアディポネクチン受容体発現促進剤を有効成分として含有する動脈硬化症の予防または治療薬、

(15) インスリンまたはインスリン遺伝子を含む、アディポネクチン受容体発現抑制剤、

(16) 被験物質をPI3キナーゼおよびPI3キナーゼ基質と接触させる工程を含む、アディポネクチン受容体発現促進剤、アディポネクチン抵抗性改善剤、インスリン抵抗性改善剤、肥満症改善剤、糖尿病治療薬、動脈硬化症治療薬のスクリーニング方法、

(17) 被験物質をAktおよびFoxoIと接触させる工程を含む、アディポネクチン受容体発現促進剤、アディポネクチン抵抗性改善剤、インスリン抵抗性改善剤、肥満症改善

剤、糖尿病治療薬、動脈硬化症治療薬のスクリーニング方法。

発明の効果

- [0013] 本発明により、インスリンがアディポネクチン受容体の制御に関与していることおよびその機構が解明されると同時に、具体的なアディポネクチン受容体発現促進剤の提供が始めて実現された。アディポネクチン受容体発現促進剤は、アディポネクチン抵抗性とインスリン抵抗性の双方を解消し、インスリン抵抗性やII型糖尿病の新規治療薬として有用である。

図面の簡単な説明

- [0014] [図1]AdipoR1/R2遺伝子発現への栄養制御の影響を示す図である。無制限摂食、絶食、再摂食状況下マウスの肝臓(A,B)、骨格筋(A,B)のAdipoR1(A,C)およびAdipoR2(B,D)発現レベル、血液グルコース(E)、血漿インスリン(F)を比較した。コントロールの摂食グループ(ad lib)は自由に餌を食べることができた(レーン1)。絶食グループ(fasted)は48時間食事から隔絶された(レーン2)。再摂食グループ(refed)は、48時間の絶食の後6時間自由に食事を取ることが許された(レーン3)。トータルRNAをTRIzolを用いて上記組織から調製した。AdipoRs mRNA定量はリアルタイムPCR法によって行った。プライマーセットとプローブは、Experimental Proceduresに指示されたとおりである。各AdipoRs 転写物の総量は β アクチン転写物の量に対し標準化した。結果は摂食コントロールグループの肝臓中のAdipoR1値に対する比として表した。各バーは平均値 \pm 標準誤差(n=3)(* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;絶食マウスとの比較)を表す。

[図2]コントロールマウスおよびSTZ処理マウスのインスリン存在下または非存在下の血漿インスリン(A)、血液グルコース(B)、AdipoR1(C)およびAdipoR2(D)mRNAを示す図である。トータルRNAの調製およびAdipoRs mRNAの定量を図1に記載したのと同様に実施した。結果は非STZマウス骨格筋中のAdipoR1値の比として表した。各バーは平均値 \pm 標準誤差(n=3)(* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;インスリン処理無しのSTZマウスとの比較)を表す。

[図3]LY294002またはPD98059存在下または非存在下(C,D)でインキュベートしたインスリン処理または非処理を受けた、あるいはLacZまたはFoxo1(E,F)を含むアデノウ

ウイルスでトランスフェクトされたマウス肝細胞(A,B)またはC2C12筋細胞(C-F)中のAdipoR1 (A,C,E)およびAdipoR2 (B,D,F) mRNA量を示す図である。マウス肝臓から肝細胞を単離し、Experimental Procedures記載のとおりインキュベートした。その後、細胞を記載濃度のインスリン存在下または非存在下で6時間インキュベートした。トータルRNAの調製とAdipoRs mRNAの定量を図1記載の方法と同様にして行った。結果は、溶媒コントロール中のAdipoR1値に対する比として示した。各バーは平均値±標準誤差 (n=3) (*,P<0.05,**,P<0.01;溶媒処理細胞との比較)を表す。

[図4]野生型 (C57BL/6) および ob/obマウスの肝臓、ヒラメ筋、EDL、WAT、及びBATにおけるAdipoR1 (A)およびAdipoR2 (B) mRNA発現、発現、血液グルコース (C)、血漿インスリン (D)を示す図である。トータルRNAの調製およびAdipoRs mRNAの定量は図1記載のとおり行った。結果は野生型マウス肝臓中のAdipoR1値に対する比として示した。各バーは平均値±標準誤差 (n=3) (*,P<0.05,**,P<0.01;野生型およびob/obマウス間)を表す。

[図5]野生型(C57BL/6) および ob/obマウスにおける骨格筋膜画分へのglobular (gAd) (A)または全長アディポネクチン (Ad) (B)の結合および骨格筋中のアディポネクチンによるAMPK活性化 (C,D)を示す図である。野生型(C57BL/6) または ob/obマウスにおける骨格筋膜画分へのgAdまたはAdの結合についてスキッチャードプロット分析を表す(A,B)。リン酸化された野生型(C57BL/6) および ob/obマウス由来骨格筋AMPK (C)の α サブユニットは、全長アディポネクチン (Ad, 50 μ g body weight)または溶媒の処理を5分間受けている。抗pAMPKと抗AMPKを用いてイムノブロット分析を行った。pAMPK量は同じサンプルからのAMPK量によって標準化した。結果は溶媒処理野生型マウスの値に対する比として表した。各バーは平均値±標準誤差 (n=5-7) (*,P<0.05,**,P<0.01;野生型マウスとの比較)を表す。

発明を実施するための最良の形態

[0015] 本発明は、FoxoIタンパク質またはFoxoI遺伝子を含むアディポネクチン受容体発現促進剤に関する。本発明者らは、インスリンがアディポネクチン受容体の発現を制御し、該制御がPI3キナーゼシグナル経路を介していることを見出すとともに、PI3キナーゼシグナル経路のメンバーであるFoxoI(常時活性型)の強制発現が、インスリンによ

るアディポネクチン受容体(AdipoR1/R2)発現抑制を低減することを確認した。また、糖尿病モデルマウスを用い、AdipoR1/R2発現レベルが”アディポネクチン感受性”と呼ぶべきアディポネクチンによるAMPK活性化およびアディポネクチン結合性を制御していることを、初めて見出した。FoxoIは、FKHRとも称されるフォークヘッド型転写因子である。本発明におけるFoxoIタンパク質およびFoxoI遺伝子とは、それぞれ、野生型および常時活性型のいずれをも含む。マウスFoxoI(野生型)タンパク質のアミノ酸配列を配列番号:1に、cDNA配列を配列番号:2に示す。マウスFoxoI(常時活性型)のアミノ酸配列を配列番号:3に示す。ヒトFoxoIタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:4に、cDNA配列を配列番号:5に示す。

[0016] FoxoIタンパク質およびFoxoI遺伝子は、当業者に周知の方法によって、調製することができる。例えば、ヒトまたはマウスのFoxoIタンパク質を発現する細胞、例えば、骨格筋細胞、肝細胞、脂肪組織から調製したmRNAを鋳型としてcDNAライブラリーを常套手段により調製し、配列番号2または5に記載の塩基配列の一部または全部、あるいは配列番号3に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの全部または一部をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、FoxoI cDNAを調製することができる。または、配列番号2または5に記載の塩基配列の一部、あるいは配列番号3に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの一部をプライマーとし、上記のように調製したmRNAを鋳型として、RT-PCRにより調製することができる。さらに該cDNAを適当な発現ベクターに挿入し、宿主細胞に導入して発現させて精製することにより、目的のFoxoIタンパク質を調製することができる。

[0017] 宿主・ベクター系は、目的にあわせて選択することができ、原核細胞系、真核細胞系、または無細胞系の発現系および、これらの発現系に適合するベクターの組み合わせの中から選択することができる。また、原核細胞系としては、大腸菌、枯草菌、放線菌などを例示することができ、真核細胞系であれば、酵母、糸状菌、動物培養細胞等を用いることができる。

[0018] 例えば、大腸菌を宿主とする場合は、pET、pPRO、pBAD等のベクターを選択することができる。また精製時の効率化を目的として、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させるベクターを選択してもよく、例えば、GST(glutathione S-transferase)

との融合タンパク質として発現させるpGEX、CBP(カルモジュリン結合ペプチド)との融合タンパク質として発現させるpCAL、8アミノ酸(Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)との融合タンパク質として発現させるpFLAGなどのベクターを用いることができる。枯草菌を宿主とする場合のベクターの例としては、pUB110、pAM α 1等、放線菌を宿主とする場合のベクターの例として、pIJ702を挙げることができる。酵母の場合は、YES2、pESCなどのベクターを例示することができる。昆虫細胞や哺乳動物細胞を宿主とするときは、バキュロウイルスを用いることができる。哺乳動物細胞内のバキュロウイルスベクターとしては、例えば、pAcCAGMCS1を挙げることができる。

- [0019] 宿主に発現させたFoxoIタンパク質は、公知の技術によって精製することができる。GSTやHis₆との融合タンパク質として発現させた場合は、それぞれ、グルタチオンセファロースカラム、ニッケルカラムによりアフィニティー精製することが可能である。また、上記FLAG発現ベクターを用いたときは、FLAGペプチドに対する市販のモノクローナル抗体を用いて、アフィニティー精製することができる。
- [0020] また上記FoxoIタンパク質に構造的に類似し、FoxoIタンパク質と同様の機能を有するタンパク質も、アディポネクチン受容体発現促進剤として利用することができるため、「FoxoIタンパク質に構造的に類似し、FoxoIタンパク質と同様の機能を有するタンパク質」(以下、「FoxoIタンパク質に類似するタンパク質」)も本発明のFoxoIタンパク質に含まれる。「FoxoIタンパク質に類似するタンパク質」には、天然のヒトまたはマウスFoxoI変異体、他の生物(例えば、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ロバ、サル、チンパンジー等の哺乳類や鳥類)から単離されるFoxoIのホモログ、オーソログ、ヒトまたはマウスFoxoIの人工的変異体が含まれる。具体的には、「配列番号1、3または4に記載の配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、置換、不可、および／または挿入したアミノ酸配列を含むタンパク質」、「配列番号2または5に記載の塩基配列にストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドでコードされるタンパク質」である。
- [0021] 本発明において、付加、欠失、挿入、または／および置換されるアミノ酸の数は、インスリンによるAdipoR1および／またはR2発現抑制を低減させる作用を有する限り、

特に制限はない。通常は、全アミノ酸数の10%以内、好ましくは全アミノ酸数の3%以内、より好ましくは全アミノ酸数の1%以内である。

[0022] FoxoIタンパク質に類似するタンパク質は、当業者にとって周知の方法によって調製することができる。例えば、配列番号2または5に記載の塩基配列の一部をプローブとし、ヒトを含めた哺乳類の骨格筋細胞、脂肪細胞、肝細胞からストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件の下でFoxoIと相同性の高いタンパク質のDNAを単離し、該DNAを発現させてFoxoIタンパク質に類似するタンパク質を調製することができる。または後述するFoxoIに類似するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを発現させることにより、FoxoIタンパク質に類似するタンパク質を調製することができる。

[0023] 上記ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件は、当業者であれば、適宜選択することができる。一例を示せば、25%ホルムアミド、より厳しい条件では50%ホルムアミド、4×SSC、50mM Hepes pH7.0、10×デンハルト溶液、20 μg/ml変性サケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で一晩プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、42℃で一晩保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後の洗浄における洗浄液および温度条件は、「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度で、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度で、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65℃」程度で実施することができる。このようにハイブリダイゼーションの洗浄の条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するポリヌクレオチドの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

[0024] このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、通常、本発明者らにより同定されたポリペプチドとアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも40%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは少なくとも95%以上、さらに好ましくは少なくとも97%以上（例えば、98から99%）の配列の

相同性を指す。アミノ酸配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol.215:403-410, 1990)。BLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

- [0025] 上述のようにして調製したポリペプチドが、インスリンによるAdipoR1および/またはR2発現抑制を低減させる作用を有するかどうかは、当業者にとって公知の技術によって、確認することができる。確認方法の一例を挙げれば、実施例6の記載のように、該ポリペプチドをアデノウイルスを用いてマウス筋芽細胞株、例えばC2C12細胞株に発現させ、該細胞株をインスリン処理した後、該細胞株中のAdipoR1/R2のmRNA発現量を配列番号10,11,13,14に記載の配列からなるプライマーを用いて測定することにより、AdipoR1および/またはR2の発現促進作用を確認することができる。アデノウイルスベクターの構築は、非特許文献22に記載の方法により行うことができる。
- [0026] またFoxoIに類似するタンパク質をコードするポリヌクレオチドも、FoxoIと同様に、アディポネクチン受容体発現促進剤として用いることができる。本発明においてFoxoI遺伝子とは、「FoxoIに類似するタンパク質をコードするポリヌクレオチド」も包含する。本発明のFoxoIに類似するタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、配列番号2または5記載の塩基配列に、PCRによる変異導入法やカセット変異法などの当業者に周知の遺伝子改変方法を施し、部位特異的にまたはランダムに変異を導入することによって、調製することができる。または配列番号2または5記載の塩基配列に変異を導入した配列を、市販の核酸合成装置によって合成することも可能である。
- [0027] 上記本発明のFoxoI遺伝子は、ヒト等において遺伝子治療によりFoxoIタンパク質を発現させ、アディポネクチン受容体発現の促進に用いることができる。FoxoI遺伝子は、そのままポリヌクレオチドの状態でアディポネクチン受容体発現促進剤とすることもできるが、適当なベクターに挿入した状態でアディポネクチン受容体発現促進剤とす

ることが望ましい。ベクターは、遺伝子治療用途のベクターの中から選択することができ、例えばレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ベクター(AAV)、アデノウイルス／アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクター、人工リポソームベクター等の中から選ぶことができる。

[0028] また本発明は、PI3キナーゼ-FoxoI経路阻害剤を含む、アディポネクチン受容体発現促進剤に関する。本発明者らは、インスリンによるアディポネクチン受容体発現制御がPI3キナーゼ経路を介してしていることを、初めて明らかにした。PI3キナーゼ-FoxoI経路阻害剤の一例として、PI3キナーゼ阻害剤であるLY294002(CAS No.: [154447-36-6], 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one)、ワルトマニン(wortmaninn, CAS No.: [19545-26-7])を挙げることができ、好ましい例としては、LY294002を挙げることができるが、これらに限定されることはない。PI3キナーゼ活性を阻害する限り、該物質は本発明のアディポネクチン受容体発現促進剤に含まれる。また、Akt活性阻害物質、FoxoIリン酸化阻害物質も、PI3キナーゼ-FoxoI経路における阻害剤として、本発明のアディポネクチン受容体発現促進剤となる。

[0029] 本発明者らは、アディポネクチン受容体の発現低下はアディポネクチン抵抗性を導き、さらにアディポネクチンの作用不全により、インスリン抵抗性が惹起されることを初めて示した。すなわち本発明のアディポネクチン受容体発現促進剤は、アディポネクチン抵抗性改善剤、インスリン抵抗性改善剤として利用することができる。また、アディポネクチンは、インスリン抵抗性の改善により、肥満、糖尿病、動脈硬化を抑制するとともに、動脈壁に対する直接的な作用によっても動脈硬化を抑制することが知られている。すなわち本発明のアディポネクチン受容体発現促進剤は、肥満症予防または改善剤、糖尿病予防または治療薬、動脈硬化症の予防または治療薬として、高い利用価値がある。

[0030] 本発明のFoxoIタンパク質、FoxoI遺伝子、PI3キナーゼ-Akt経路阻害剤を薬剤として用いる場合は、上記物質を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与することも可能である。例えば、薬理学的に許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、入荷剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤などと適宜組み合わせる製剤化し、投与することが考えられる。患者への投

与は、例えば、動脈、静脈内、皮下投与の他、筋肉投与、経口投与、経皮投与等の公知方法によることができる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適切な投与量を適宜選択できる。

[0031] また本発明は、インスリンまたはインスリン遺伝子を含む、アディポネクチン受容体発現抑制剤に関する。上述のとおり、インスリンはアディポネクチン受容体の発現を下方制御してアディポネクチン抵抗性およびインスリン抵抗性を惹起することが明らかになった。インスリンおよびインスリン遺伝子を含むアディポネクチン受容体発現抑制剤は、アディポネクチン抵抗性、インスリン抵抗性のさらなる機構解明のための試薬として重要である。マウスインスリンのアミノ酸配列を配列番号6に、マウスインスリンのcDNA配列を配列番号7に、ヒトインスリンのアミノ酸配列を配列番号8に、ヒトインスリンのcDNA配列を配列番号9に示す。

[0032] インスリンおよびインスリン遺伝子は、当業者にとって周知の方法によって調製することができる。例えば、マウスまたはヒト膵臓の細胞からmRNAを調製し、配列番号7または9に記載の塩基配列の一部をプライマーとしてRT-PCRを実施することによりインスリン遺伝子を調製することができる。あるいは、配列番号7または9に記載の塩基配列の一部をプローブとし、マウスまたはヒト膵臓の細胞から調製したcDNAライブラリーからスクリーニングしてインスリン遺伝子を調製することができる。上記のように調製したインスリン遺伝子を、適当な宿主-ベクター系によって発現させて精製させることにより、目的のインスリンタンパク質を調製することができる。

[0033] 上記インスリンタンパク質は、アディポネクチン受容体を発現する細胞に接触させることにより、細胞中のアディポネクチン受容体発現量を低下させることができると考えられる。また、同様にインスリン遺伝子は、アディポネクチン受容体発現細胞に導入することにより、アディポネクチン受容体発現量が低下した細胞を作製することができる。このような細胞は、アディポネクチン抵抗性、インスリン抵抗性、糖尿病などのメカニズムを解明するために利用することができる。

[0034] さらに、インスリン遺伝子をマウス等の動物に導入すれば、アディポネクチン受容体の発現が持続的に低下した動物を作製できると考えられる。インスリン遺伝子を動物

に導入する場合は、インスリン遺伝子断片をパーティクルガン法等により導入してもよいが、上述した遺伝子治療用途のベクターを用いて導入することが望ましい。上記動物は、アディポネクチン抵抗性、インスリン抵抗性、糖尿病のモデル動物として、これらの機構解明および治療薬・治療方法の開発に特に有用であると考えられる。

[0035] さらに本発明は、被験物質をPI3キナーゼおよびPI3キナーゼ基質と接触させる工程を含む、アディポネクチン受容体発現促進剤、アディポネクチン抵抗性改善剤、インスリン抵抗性改善剤、肥満症改善剤、糖尿病治療薬、動脈硬化症治療薬のスクリーニング方法に関する。実施例に記載のとおり、PI3キナーゼ阻害物質がインスリンによるアディポネクチン受容体発現抑制を阻害することが確認され、インスリンによるアディポネクチン受容体発現阻害はPI3キナーゼ経路を介することが明らかになった。したがって、PI3キナーゼ阻害活性はアディポネクチン受容体発現促進剤の選別の指標となりうる。

[0036] 本発明の方法の第一の態様として、精製されたPI3キナーゼを用いたin vitroの系を挙げることができる。上記系においては、被験物質をPI3キナーゼおよびPI3キナーゼ基質と接触させる工程に続き、被験物質存在下のPI3キナーゼ活性を検出する工程、被験物質存在下のPI3キナーゼ活性と被験物質非存在下におけるPI3キナーゼ活性とを比較し、被験物質存在下のPI3キナーゼ活性が非存在下のPI3キナーゼ活性よりも低い場合に、該被験物質を選択する工程を行うことができる。PI3キナーゼは、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ を基質として $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ を産生する反応を触媒する。上記反応の活性は、公知方法によって測定することができる。例えば、被験物質存在下または非存在下において、 P^{32} または P^{33} を用いてPI3キナーゼによるホスファチジルイノシトール基質リン酸化反応を行い、該リン酸化反応による放射性生成物を抽出し、薄層クロマトグラフィによって分離・検出し、被験物質存在下と非存在下の活性を比較して該被験物質のPI3キナーゼ活性阻害を測定することができる。また、被験物質存在下においてPI3キナーゼを基質と反応させ、産生された $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ をELISA法で測定しても良い。この方法は、市販のELISA法によるPI3キナーゼ測定用キット(PI3-Kinase ELISA Kit, Echelon Biosciences, Inc)を用いれば、簡便に行うこともできる。また、FRET(fluorescence resonance energy transfer)の原理を応用したPI3キナーゼアッセイ(PI

ProfilerTM, UPSTATE 社)によって測定することもできる。

- [0037] また本発明の方法の第二の態様として、PI3キナーゼを発現する細胞を被験物質とインキュベートすることにより、細胞内において被験物質とPI3キナーゼおよびPI3キナーゼ基質を接触させる工程を含む系を挙げることができる。この系においては、該細胞内において被験物質とPI3キナーゼを接触させる工程に続き、該細胞中におけるPI(3,4,5)P₃を測定する工程、被験物質存在下におけるPI(3,4,5)P₃測定値と被験物質非存在下におけるPI(3,4,5)P₃測定値とを比較し、被験物質存在下における測定値の方が低い場合に該被験物質を選択する工程を行うことができる。PI(3,4,5)P₃の測定は、細胞ライセートを調製し、特異的抗体を用いたイムノアッセイにより、ライセート中のPI(3,4,5)P₃を測定することができる。
- [0038] 本発明の方法における被験物質として、核酸、タンパク質、ポリペプチド、合成低分子化合物、細胞抽出物、天然物抽出物が挙げられるが、これらに制限されず、そのほかの物質であってもよい。本発明の方法によってスクリーニングされた被験物質はPI3キナーゼ阻害作用を通じてアディポネクチン受容体発現を促進すると考えられ、アディポネクチン受容体発現促進剤、アディポネクチン抵抗性改善剤、インスリン抵抗性改善剤、肥満症改善剤、糖尿病治療薬、動脈硬化症治療薬として利用可能である。
- [0039] また本発明は、AktおよびFoxoIと接触させる工程を含む、アディポネクチン受容体発現促進剤、アディポネクチン抵抗性改善剤、インスリン抵抗性改善剤、肥満症改善剤、糖尿病治療薬、動脈硬化症治療薬のスクリーニング方法に関する。本発明の方法は、FoxoIのリン酸化を指標に上記物質をスクリーニングする。本発明の実施例により、インスリンはFoxoIの不活性化を介してAdipoR1/R2発現を阻害することが示された。また、FoxoIの特定残基のリン酸化は、結果的にFoxoIの標的遺伝子転写活性を抑制し、一方、AdipoR1/R2のプロモーター領域にはFoxoIと結合可能なシス活性エレメントが含まれる。上記から、FoxoIはAktによってリン酸化されて不活性化し、アディポネクチン受容体発現を抑制すると考えることができ、したがって、リン酸化FoxoIの測定はアディポネクチン受容体発現促進剤のスクリーニングの指標となるということ

ができる。

[0040] 本発明の方法は、第一の態様として、精製されたAktおよびFoxoIを用いたin vitroの系として実施することができる。上記系では、被験物質をAktおよびFoxoIと接触させる工程に続き、被験物質存在下または非存在下でリン酸化FoxoIを測定する工程、被験物質存在下のリン酸化FoxoI測定値と被験物質非存在下におけるリン酸化FoxoI測定値とを比較し、被験物質存在下のリン酸化FoxoI測定値が非存在下の活性よりも低い場合に該被験物質を選択する工程を実施する。上記方法は、公知手段によって実施することができる。例えば、被験物質存在下においてin vitroでAktとFoxoIを接触させた後にリン酸化特異的抗体と反応させ、リン酸化FoxoIをイムノアッセイにより測定することができる。使用するリン酸化特異的抗体は、Aktによりリン酸化される残基を認識することが望ましい。このような抗体として、例えば、Phospho-FKHR(Ser256) Antibody、Phospho-FKHR(Thr24) /FKHR1(Thr32) Antibody (いずれもCell Signaling社)などの市販品がある。

[0041] また本発明の方法の別の態様として、AktおよびFoxoIを発現する細胞を被験物質存在下または非存在下でインキュベートすることにより、細胞内において被験物質をAktおよびFoxoIと接触させる工程を含む系を挙げることができる。この系の場合は、上記工程に引き続き、細胞内のリン酸化FoxoIを測定する工程、被験物質存在下のリン酸化FoxoI測定値と被験物質非存在下におけるリン酸化FoxoI測定値とを比較し、被験物質存在下のリン酸化FoxoI測定値が非存在下の活性よりも低い場合に該被験物質を選択する工程を実施する。細胞内のリン酸化FoxoIの測定は、例えば、細胞ライセートを調製し、上記と同様の方法により測定することができる。

[0042] 本発明の方法における被験物質として、核酸、タンパク質、ポリペプチド、合成低分子化合物、細胞抽出物、天然物抽出物が挙げられるが、これらに制限されず、そのほかの物質であってもよい。本発明の方法によってスクリーニングされた物質は、インスリンによるFoxoI不活性化を抑制する作用を有し、結果的にアディポネクチン受容体発現を促進するため、アディポネクチン受容体発現促進剤、アディポネクチン抵抗性改善剤、インスリン抵抗性改善剤、肥満症改善剤、糖尿病治療薬、動脈硬化症治療薬として利用可能である。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0043] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、本実施例で使用した全ての試薬は参考文献(非特許文献6,10,14,19)中の供給元から入手した。

[0044] (実施例1) AdipoR1/R2遺伝子発現の絶食による増強および再摂食による減少

AdipoR1かつ／またはAdipoR2の発現が、生理学的かつ／または病態生理学的状態下で制御されるか否かを明らかにするため、無制限の給餌下、絶食下および再摂食下に置いたマウスを用い、インスリンおよびアディポネクチン標的臓器におけるAdipoR1およびAdipoR2の発現レベルを検討した。

[0045] 15週齢の雄のC57BL/6マウスをCharles River Breeding Laboratories (Washington, MA)から入手し、12時間明／12時間暗のサイクルを維持したコロニーケージで飼育した。暗サイクルの始まり(9:00p.m.)から48時間、上記動物を食物がある状態、または食物の無い状態に置いた。再摂食グループは、絶食48時間後に再び餌を与え、組織単離のために再摂食から6時間後に絶命させた。食物は、脂肪1152g (Benibana, 日本、サフラワー油(高オレイン酸タイプ)、総脂肪酸中46%オレイン酸(18:1n-9)、45%リノレン酸(18:2n-6含有))カゼイン1191.6g (オリエンタル酵母、東京、日本、No.19)、スクロース633.6g (オリエンタル酵母、東京、日本、No.13)、混合ビタミン50.4g (オリエンタル酵母、No.20(AIN76))、混合ミネラル352.8g (オリエンタル酵母、No.20(AIN76))、セルロース粉末201.6g (オリエンタル酵母、No.19)、DL-メチオニン18g (和光純薬、大阪、日本)、水360ml;全量3600gの高脂肪食を与えた(文献19)。

[0046] Adipo受容体mRNAを定量するため、リアルタイムPCR法を実施した(文献14)。トータルRNAは、TRIzol(GIBCO/BRL)を用い、製造業者の指示書に従って細胞または組織から調製した。各AdipoR転写物の相対量は、同じcDNA中のアクチン転写物量に対して標準化した(文献14)。上記定量に用いたプライマーセットおよびプローブを、以下に示す。

mAdipoR1用

フォワードプライマー: acgttgagagtcaccccgtat (配列番号10)

リバースプライマー: ctctgtgtggatgcggaagat (配列番号11)

プローブ: cctgctacatggccacagaccacct (配列番号12)

mAdipoR2用

フォワードプライマー: tcccaggaagatgaagggttat (配列番号13)

リバースプライマー: ttccattcggttcgatagcatga (配列番号14)

プローブ: atgtccccgctcctacaggccc (配列番号15)

[0047] 肝臓におけるAdipoR1およびAdipoR2のmRNA発現は、48時間の絶食後に劇的に上昇し、再摂食によって本来の摂食状態と同レベルまでにすばやく回復した(図1A,1B)。骨格筋においても同様に、絶食および再摂食によるAdipoR2 mRNAの発現制御が、観察された(図1C,1D)。

[0048] (実施例2) 血漿インスリンレベルとAdipoR1/R2遺伝子の発現レベルとの逆相関関係
上記実施例1で絶食および給餌に反応してAdipoR1/R2遺伝子発現が制御されることが確認されたが、上記制御に特定のホルモンまたは栄養素が関与している可能性がある。インスリンは栄養時の古典的ホルモンであることから、無制限摂食、絶食および再摂食状態においた上記マウスの血漿インスリンレベルを測定した。血漿インスリンはインスリンイムノアッセイ(シバヤギ、群馬、日本)で測定した。

[0049] 予想通りに、絶食は血漿インスリンレベルを減少させ(図1F)、再摂食は血漿グルコース値と並行してインスリンレベルを上昇させた(図1E)。これらの知見は、血漿インスリン値はAdipoR1/R2遺伝子の発現量と逆の相関関係があることを示唆し、インスリンがAdipoR1/R2発現をコントロールしうる可能性を提示する。

[0050] (実施例3) AdipoR1/R2発現のSTZ処理による増強およびインスリンによる減少
AdipoR1/R2発現に対するインスリンの効果をさらに検討するため、streptozotocin (STZ)処理をマウスに施し、該マウスにおけるAdipoR1/R2発現を観察した。STZは、膵臓β細胞を破壊し、急性インスリン欠乏症を引き起こす。糖尿病を誘導するため、STZ(200mg/kg body weight)を含む50mMクエン酸ナトリウム溶液(pH4.5) 0.2-0.3mlをマウスに二重腹腔内投与した。対照マウスには、50mMクエン酸ナトリウム溶液(pH4.5)を注射した。注射後三日間にわたり、血漿グルコースレベルを測定し、糖尿

病を確認した(グルコース値 $>250\text{mg/dl}$)。ヒトレギュラーインスリン(1単位/kg; Eli Lilly, Indianapolis, IN)を生理食塩水0.2mlに溶解し、STZおよびインスリン処理群に投与した。STZおよび溶媒処理群のマウスおよび非STZ処理群には、0.2mlの生理食塩水を腹腔内投与した。インスリンまたは生理食塩水を投与してから動物を6時間絶食させた後、絶命させて後肢の骨格筋を採取した。

[0051] STZ処理は血漿インスリンを消滅させ(図2A)、同時に血漿グルコースの著しい増加を引き起こした(図2B レーン1,2)。STZおよびインスリン処理群は、STZ単独処理群よりも少ない血漿グルコース値を示した。(図2B レーン2,3)。

[0052] 次に、骨格筋および肝臓抽出物中のAdipoR1およびR2のmRNA量を測定した。mRNA量測定は上述と同様の方法で行った。STZ処理マウスでは骨格筋中のAdipoR1およびAdipoR2のmRNAは、それぞれ103%と38%の増加を示したが(図2C,2D)、インスリン処理により殆ど完全に回復した。これらの知見は、インスリンがAdipoR1/R2 mRNAレベルを減ずる可能性を支持するものである。STZ処理は肝臓のAdipoR1/R2 mRNAレベルには殆ど影響を与えなかったが、一方、インスリンはSTZ処理マウス肝臓中のAdipoR1/R2レベルを著しく減少させた(データ示さず)。これらのデータは、炎症がAdipoR1/R2 mRNAレベルを減少させる可能性があるとの知見や(Tsuchida, Yamauchi, Kadowaki, 原稿準備中)、STZ処理は肝臓に炎症を誘導するという報告(文献23)によって説明されると考えられる。

[0053] (実施例4) インスリンによるin vitro AdipoR1/R2 mRNAレベルの減少

肝細胞でのAdipoR1/R2発現に対するインスリンの直接的効果を検討した。絶食中の8週齢雄C57BL/6マウスから、肝細胞をコラゲナーゼ灌流法により調製した(文献20)。 0.8×10^6 の一定量の細胞を、コラーゲンIでコートした12穴の皿上の、5%(v/v) ウシ胎児血清、10nMデキサメタゾン、1nMインスリン、100units/mlペニシリン、100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンを添加したWilliams培地E中に置いた。5%CO₂、37°Cで5時間インキュベーションした後、細胞をPBSで2度洗浄し、1%ウシ血清アルブミンを添加したWilliams培地Eで6時間インキュベートした。細胞を1%ウシ血清アルブミンおよび100nMインスリンを添加したWilliams培地Eに移し、100nMインスリン存在下または非存在下で6時間培養した。肝細胞を回収し、トータルAdipoR1,R2 mRNA量を測定した。

。その結果、インスリンはAdipoR1/R2 mRNA全量を減少させた(図3A,3B)。

- [0054] インスリンによるAdipoR1/R2 mRNA量の減少の可能性についてさらに探るため、in vitroにおいて、インスリンがC2C12筋細胞中のAdipoR1/R2 mRNA発現量に与える影響を観察した。筋原性分化の誘導は、以前に報告した方法(文献10)にしたがって実施した。すなわち、マウスC2C12筋原細胞をダルベッコ変法高グルコースイーグル培地(DMEMH;90%)/10%(v/v)FBSで培養し、細胞が80%コンフルエントになったときに低血清分化培地(98%DMEMH/2.5%(v/v)ウマ血清)に置き換え、培地を毎日交換し、筋原細胞を筋管へ分化するよう誘導した。5日目までに細胞は多核収縮筋管に分化した。上記C2C12筋細胞に10nMのインスリン処理を施すと、実際に6時間後のAdipoR1/R2が減少した(図3C,3D)。

- [0055] (実施例5)インスリンによるAdipoR1/R2 mRNA減少に対するphosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase)インヒビターによる抑制

C2C12細胞を1%ウシ血清アルブミン添加DMEMHで12時間インキュベートし、インスリン添加30分前に細胞をインスリン伝達経路阻害剤(10 μ M LY294002または10 μ M PD98059)に曝した。インスリン添加6時間後に細胞を回収し、添加6時間後のC2C12筋細胞中AdipoR1/R2 mRNAレベルを測定した(図3C,3D)。PI3-キナーゼインヒビターのLY294002は、インスリンによるAdipoR1/R2 mRNAレベル減少効果を帳消しした。逆に、mitogen-activated proteinキナーゼ活性化のインヒビターであるPD98059からは、インスリンによる反応は本質的に影響を受けなかった。上記結果から、AdipoR1/R2遺伝子発現の誘導はインスリンシグナル伝達経路のPI3-キナーゼ分岐経路を通じて仲介されているらしいとの結論が導かれる。図3Cおよび3Dに示すインヒビター効果は、試験した全ての試薬に対する最大値を示した。また、ポイントは用量反応実験で検証した(データ示さず)。

- [0056] インスリンの既知の作用の多くは、全てではないにしろ、IRS-1およびIRS-2のインスリン受容体関与チロシン-リン酸化に起因し、このリン酸化は、PI3-キナーゼ/Akt経路やMAPキナーゼ経路が関与するキナーゼカスケードの引き金となる(文献26-28)。AdipoR1/R2遺伝子発現に対するインスリン効果がMEKインヒビターであるPD98059によつては殆ど影響を受けなかったことから、mitogen-activated protein kinase カス

ケードの活性化は必要としないと考えられる。逆に、LY294002を用いた結果は明確にPI3-キナーゼシグナル伝達経路を示唆している。PI3-キナーゼインヒビターを用いたこれらの結果から、AdipoR1/R2遺伝子発現の誘導はインスリンシグナル伝達経路のPI3-キナーゼ分岐経路を通じて仲介されているらしいとの結論が導かれる。

[0057] (実施例6) Foxo1によるAdipoR1/R2 mRNAレベル増強とインスリン誘導AdipoR1/Rw mRNAレベル減少の阻害

PI3-キナーゼシグナル伝達経路は、インスリンによる幾つかの遺伝子の制御、とりわけinsulin-like growth-factor binding protein (IGF-BP1)遺伝子の制御に関与していると考えられている(文献29)。最近、PI3-キナーゼの下流エフェクターであるAktが、in vitroおよび無処置細胞において、Foxo1を含むフォークヘッドファミリーの幾つかの転写活性化因子をリン酸化することが示された。これら因子の特定残基がリン酸化されると、リン酸化された該因子は細胞質中に隔絶され、結果として標的遺伝子の転写を活性化する能力が阻害される(文献30-32)。そこで、IGF-BP1遺伝子がプロモーター中にFoxo1と結合可能なシス活性エレメントを有していることから、IGF-BP1遺伝子のインスリン依存抑制は、少なくとも部分的には、Akt仲介リン酸化およびこのフォークヘッド転写活性化因子不活性化によるものと考えられる。(文献29)。

[0058] 一方、AdipoR1/R2遺伝子もまた、プロモーター中にFoxo1と結合可能なシス活性エレメントを含んでいる。インスリン依存性のAdipoR1/R2遺伝子抑制は、少なくとも部分的には、PI3-キナーゼ/Akt-仲介リン酸化およびフォークヘッドトランス活性化因子の不活性化に依存していると考えられる(文献21、22)。そこで、Foxo1の発現がインスリン依存性のAdipoR1/R2遺伝子抑制に与える影響を観察した。マウス由来の野生型FOXO1 cDNAおよび常時活性型FOXO1(T24A/S253D/S316A(ADA)) cDNA(文献21,22)を含むアデノウイルスを用い、以前に記載した方法(文献10)に若干改変を加え、C2C12細胞をトランスフェクトした。分化誘導は、上記記載の方法にしたがって行った。5日後に指示された濃度のインスリンで上記細胞を処理し、解析に用いた。

[0059] Foxo1の常時活性型(Foxo1-ADA)の発現は、AdipoR1/R2 mRNAレベルの顕著な上昇を引き起こした。インスリンは、Foxo1の上記効果を戻すことはできなかった(図3E,3F)。これらの知見は、Foxo1はAdipoR1/R2の発現レベルを増強し、インスリンは

Foxo1不活性化を介してAdipoR1/R2 mRNA発現を抑制したことを示唆する。

[0060] (実施例7) ob/obマウスにおけるAdipoR1/R2発現レベル下方制御

インスリン耐性ob/obマウスおよびコントロールとしてC57BL/6マウスを用い、インスリン感受性組織におけるAdipoR1およびR2の発現を検討した。ob/obマウスは、レプチン遺伝子の欠損により肥満、脂肪 肝および高インスリン血症を呈する遺伝的肥満マウスである。インスリン感受性組織として、肝臓、骨格筋(ヒラメ筋、長指伸筋(EDL))、脂肪組織(白色脂肪細胞(WAT)、褐色脂肪細胞(BAT))について検討した。結果を図4Aおよび4Bに示す。コントロールのC57BL/6マウスでは、AdipoR1は骨格筋において最も豊富に発現していたのに対し、AdipoR2は肝臓において最も多く発現した。興味深いことに、AdipoR1およびR2共に、ヒラメ筋よりもEDLにおいてより多く発現した。また、WATとBATの両方の脂肪組織において、AdipoR1とR2の両方の発現が観察された。

[0061] ob/obマウスのAdipoR1およびR2の発現は共に、肝臓を除く被験組織において、C57BL/6マウスよりも著しく減少していた(図4A,4B)。ob/obマウス由来の肝臓、ヒラメ筋、EDL、WAT、BATにおけるAdipoR1の発現は、それぞれ野生型マウスの79.4%, 54.5%, 50.5%, 31.9%, 28.1%であった(図4A)。ob/obマウス由来の肝臓、ヒラメ筋、EDL、WAT、BATにおけるAdipoR2の発現は、それぞれ野生型マウスの63.3%, 51.4%, 59.5%, 7.9%, 29.4%であった(図4B)。

(実施例8) ob/obマウスにおけるAdipoR1/R2発現レベル減少と“アディポネクチン感受性”との相関関係

[0062] AdipoR1/R2の発現レベルと各組織におけるアディポネクチン効果とが関連しているかどうかについて検討した。アディポネクチンは、AMPKおよびPPAR α の活性化を介してインスリン感受性の亢進に寄与する。そこで、肥満関連インスリン抵抗性モデルマウス(ob/obマウス)および野生型マウス(C57BL/6マウス)について、骨格筋膜分画に結合するアディポネクチン量を測定すると同時に、アディポネクチンによるAMPK活性化を測定した。

[0063] 骨格筋膜分画に結合するアディポネクチン量は、以下のようにして求めた。まず、組換えマウス全長アディポネクチン(Ad)を、文献の記載にしたがって調製した(文献

10,14)。合成アディポネクチンは Na^{125}I (2,000Ci/m mol, Amersham Pharmacia Biotech)存在下でODO-ビーズ(Pierce)を用い、製造業者のプロトコールに従ってチロシンを ^{125}I で標識した。筋肉の膜分画をスクロース勾配遠心分離により精製し、指定された濃度の ^{125}I アディポネクチン(2,000cpm/ng protein)と非標識の競合物質を含むバインディングバッファー(氷冷リン酸バッファー化生理食塩水/10%スキムミルク)で4℃、1時間インキュベートした。結合実験を2時間後に4℃で実施した際、結合平衡状態の成立を確認した。氷冷のリン酸バッファー化生理食塩水で細胞を3回洗浄し、 γ カウンターを用いて膜結合放射活性を決定した(文献10,14)。非特異的結合は、200倍超の非標識のアディポネクチンを用いて決定した。特異的結合は、トータルの結合から非特異的結合を引いて算出した。Results中に示した値は、3回の実験の3重定量値の平均を表す。

- [0064] アディポネクチンによるAMPK活性化は、以下のようにして測定した。15週齢雄ob/obマウスまたは年齢の適合するC57BL/6マウスをペントバルビタールで麻酔し、下大静脈を介して上記組換えアディポネクチン(体重10gあたり50 μg)を投与した。アディポネクチン投与から5分後に骨格筋を採取した。リン酸化し骨格筋中のAMPK量をウエスタンブロット解析により決定した(文献10,14)。
- [0065] 興味深いことに、アディポネクチンはob/obマウスよりも野生型マウスの骨格筋の膜分画においてより高度に結合した(図5A,5B)。スキッチャードプロット解析により、globularアディポネクチンおよび全長アディポネクチンに対する高親和性結合部位と低親和性結合部位の両方共が、ob/obマウスの骨格筋では野生型マウス骨格筋と比較して少なくなっていることが明らかになり、AdipoR1とAdipoR2の両方の数が減少していることが示唆された(図5A,B)(文献14)。さらに、アディポネクチンは野生型マウスの骨格筋中ではAMPKを活性化できたが、一方、ob/obマウスの骨格筋中ではAMPKを活性化できなかった(図5C,5D)。これらの知見は、AdipoR1/R2発現レベルが“アディポネクチン感受性”と呼ばれるアディポネクチンによるAMPK活性化とアディポネクチンの結合を制御していることを示唆する。
- [0066] 上述のとおりついに本発明者らは、肥満関連インスリン抵抗性モデルであるob/obマウスにおいてAdipoR1/R2の発現が下方制御されていることを発見した。これまでに

本発明者らは、ob/obマウスで血漿中アディポネクチン量が減少し(文献12)、血漿アディポネクチンレベルの該変化がインスリン感受性の制御において原因的役割を果たしていることを示した。これら知見が組み合わさると、興味深い可能性が浮かび上がる。すなわち、血漿中アディポネクチンレベルに加えてAdipoR1/R2発現量の変化がインスリン感受性の制御の原因的役割を果たしているという可能性がある。これは、以前に本発明者らによって報告された、siRNAによるAdipoR1またはAdipoR2の発現減少がアディポネクチンのインスリン感作効果と関連するとの知見と一致する(文献14)。本発明者らは、マウスモデルにおけるAdipoR1またはAdipoR2の発現減少がin vivoでのアディポネクチンのインスリン感作効果と関連することを初めて証明した。

[0067] 慢性的な過食やそれによるインスリン上昇は、結果としてAdipoR1/R2発現の減少に到ることが予想される。上記減少は、アディポネクチン抵抗性とインスリン抵抗性の双方を引き起こすと思われる。AdipoR1/R2 mRNAの減少はアディポネクチン結合の減少を導き、続いて“アディポネクチン抵抗性”と名づけられたアディポネクチン効果の減少を導き、いわゆる“悪循環”をもたらす。これらの知見は、インスリン抵抗性を導く長期インスリン上昇について、既知のインスリン受容体下方制御に加え、アディポネクチン受容体の下方制御からなる新たな分子機構を提供しうるものである。

[0068] 結論として、インスリン標的組織でのAdipoR1/R2発現は、血漿インスリンレベルと逆相関関係にあると思われる。本研究は、インスリンがPI3-キナーゼ/Foxo1経路を介してアディポネクチン受容体の発現レベルを負に調節していることを、初めて示した。我々のデータは、AdipoR1/R2アゴニストだけではなくAdipoR1/R2を増加させる戦略も、インスリン抵抗性やII型糖尿病の新規治療のあり方を提供する論理的アプローチとなり得ることを示唆している。

産業上の利用可能性

[0069] 本発明のアディポネクチン受容体発現促進剤は、アディポネクチン抵抗性とインスリン抵抗性の双方を解消し、アディポネクチン抵抗性改善剤、インスリン抵抗性改善剤、肥満症改善剤、糖尿病治療薬、動脈硬化症治療薬として有用である。本発明のスクリーニング方法は、インスリンがPI3キナーゼ経路を介してアディポネクチン受容体発現を制御していることを利用したものであり、アディポネクチン抵抗性改善剤、イ

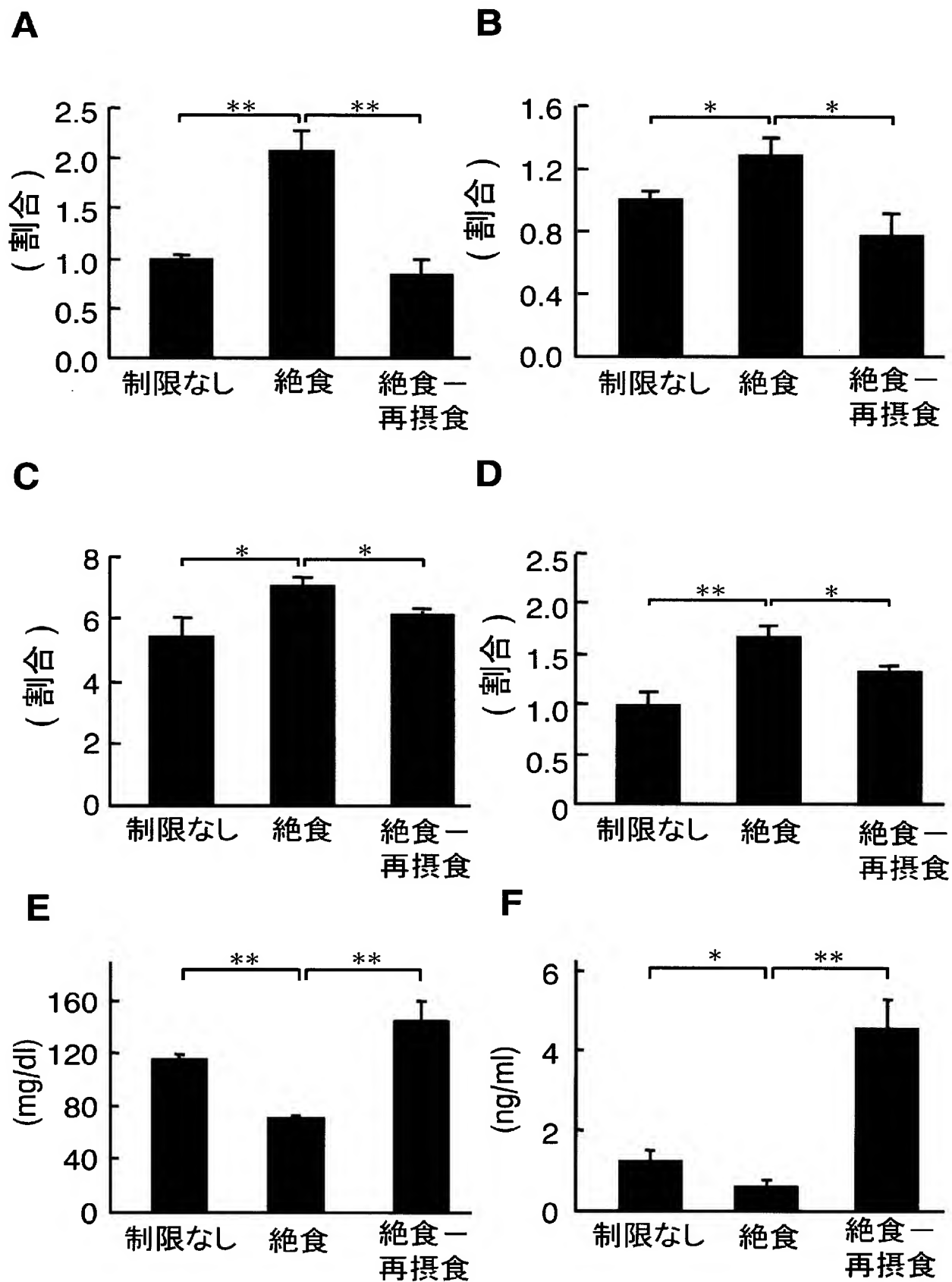
ンスリン抵抗性改善剤、肥満症改善剤、糖尿病治療薬、動脈硬化症治療薬の候補物質の発見に特に有用である。

請求の範囲

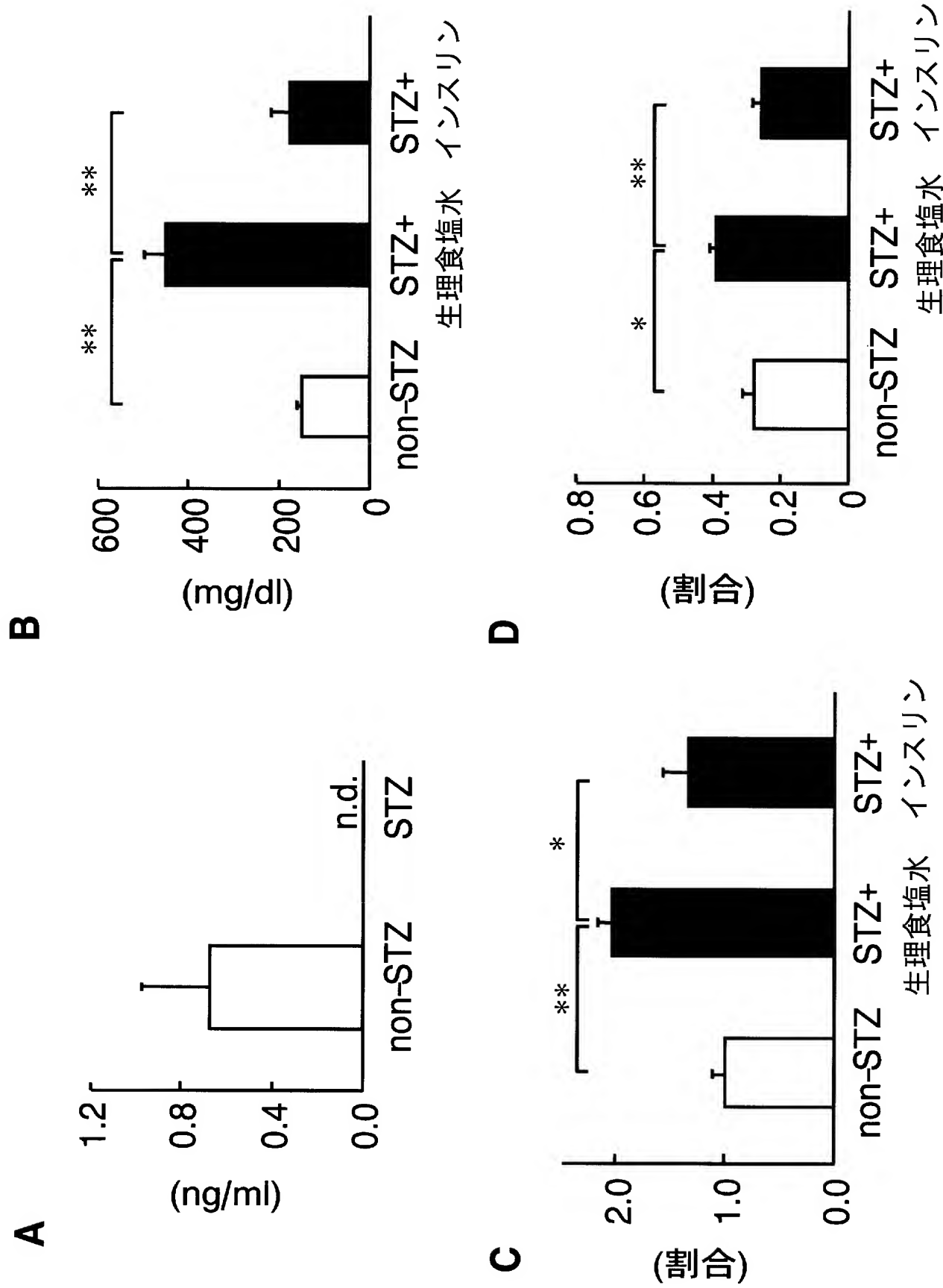
- [1] FoxoIタンパク質またはFoxoI遺伝子を含むアディポネクチン受容体発現促進剤。
- [2] FoxoIタンパク質またはFoxoI遺伝子を有効成分として含有するアディポネクチン抵抗性改善剤。
- [3] FoxoIタンパク質またはFoxoI遺伝子を有効成分として含有するインスリン抵抗性改善剤。
- [4] FoxoIタンパク質またはFoxoI遺伝子を有効成分として含有する肥満症予防または改善剤。
- [5] FoxoIタンパク質またはFoxoI遺伝子を有効成分として含有する糖尿病予防または治療薬。
- [6] FoxoIタンパク質またはFoxoI遺伝子を有効成分として含有する動脈硬化症の予防または治療薬。
- [7] PI3キナーゼ-FoxoI経路阻害剤を含む、アディポネクチン受容体発現促進剤。
- [8] PI3キナーゼ-FoxoI経路阻害剤が、PI3 (Phosphoinositide 3) キナーゼ阻害剤である、請求項7記載のアディポネクチン受容体発現促進剤。
- [9] PI3 (Phosphoinositide 3) キナーゼ阻害剤がLY294002である、請求項8記載のアディポネクチン受容体発現促進剤。
- [10] 請求項7から請求項9のいずれかに記載のアディポネクチン受容体発現促進剤を有効成分として含有するアディポネクチン抵抗性改善剤。
- [11] 請求項7から請求項9のいずれかに記載のアディポネクチン受容体発現促進剤を有効成分として含有するインスリン抵抗性改善剤。
- [12] 請求項7から請求項9のいずれかに記載のアディポネクチン受容体発現促進剤を有効成分として含有する肥満症予防または改善剤。
- [13] 請求項7から請求項9のいずれかに記載のアディポネクチン受容体発現促進剤を有効成分として含有する糖尿病予防または治療薬。
- [14] 請求項7から請求項9のいずれかに記載のアディポネクチン受容体発現促進剤を有効成分として含有する動脈硬化症の予防または治療薬。
- [15] インスリンまたはインスリン遺伝子を含む、アディポネクチン受容体発現抑制剤。

- [16] 被験物質をPI3キナーゼおよびPI3キナーゼ基質と接触させる工程を含む、アディポネクチン受容体発現促進剤、アディポネクチン抵抗性改善剤、インスリン抵抗性改善剤、肥満症改善剤、糖尿病治療薬、動脈硬化症治療薬のスクリーニング方法。
- [17] 被験物質をAktおよびFoxoIと接触させる工程を含む、アディポネクチン受容体発現促進剤、アディポネクチン抵抗性改善剤、インスリン抵抗性改善剤、肥満症改善剤、糖尿病治療薬、動脈硬化症治療薬のスクリーニング方法。

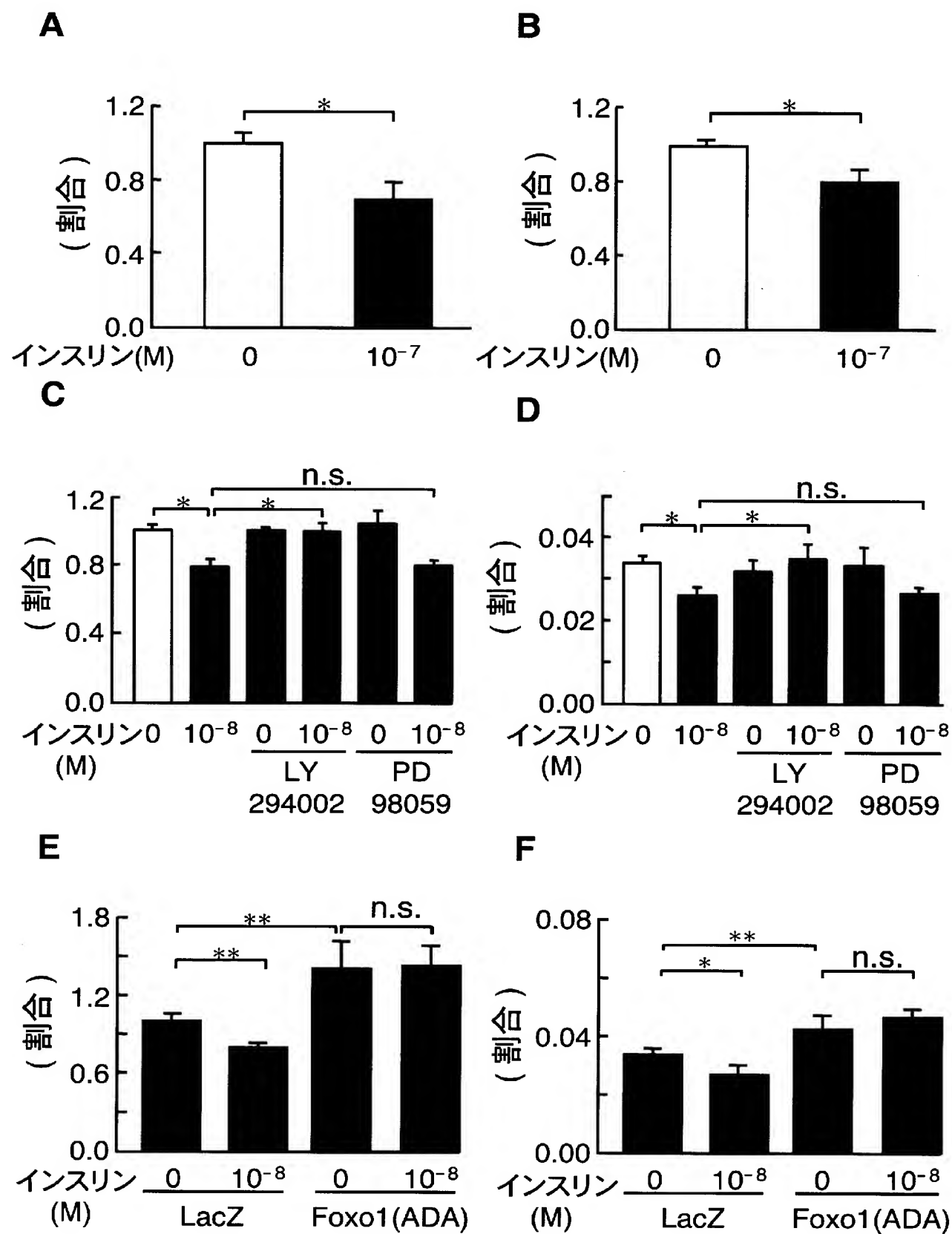
[図1]



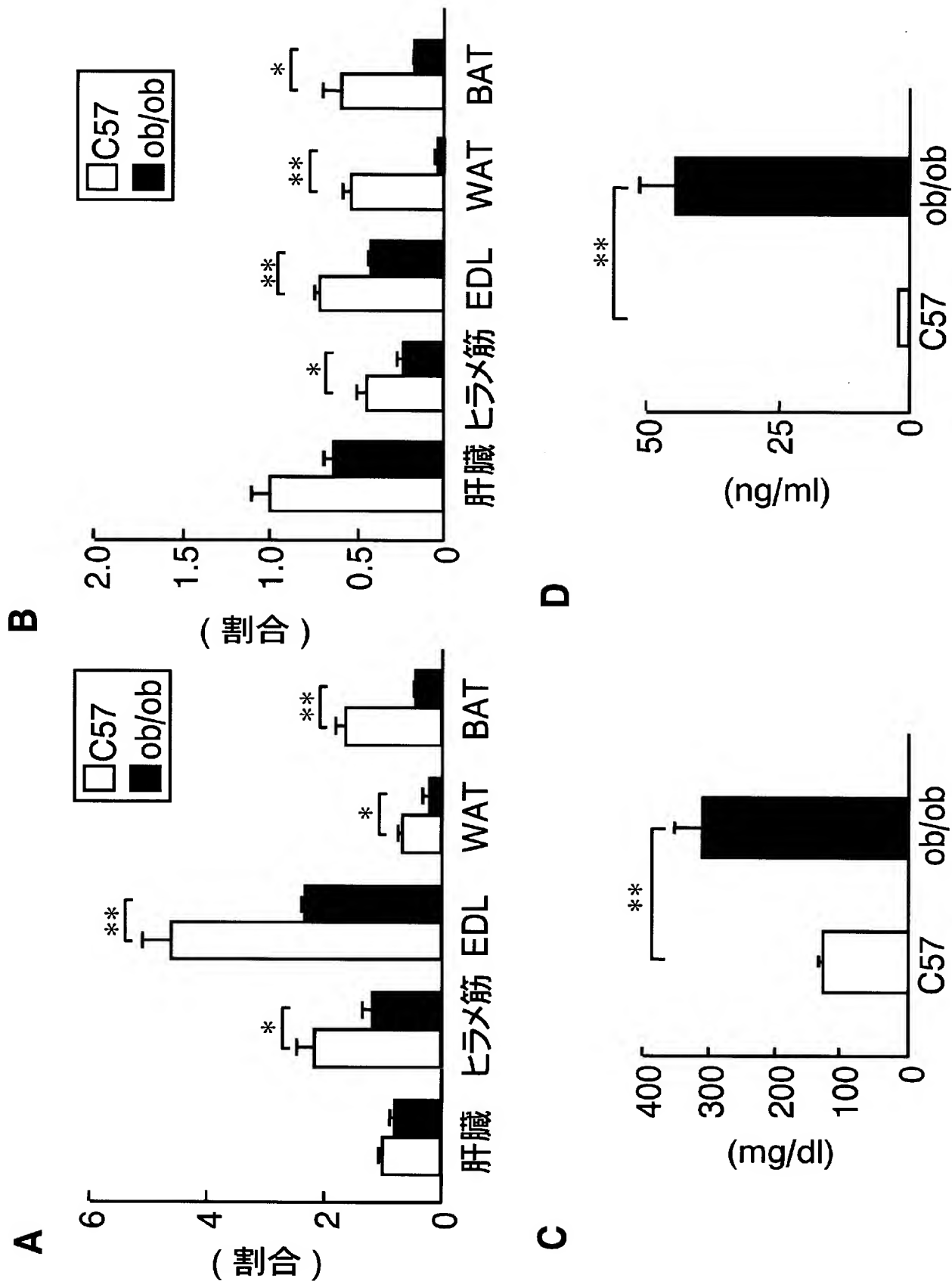
[図2]



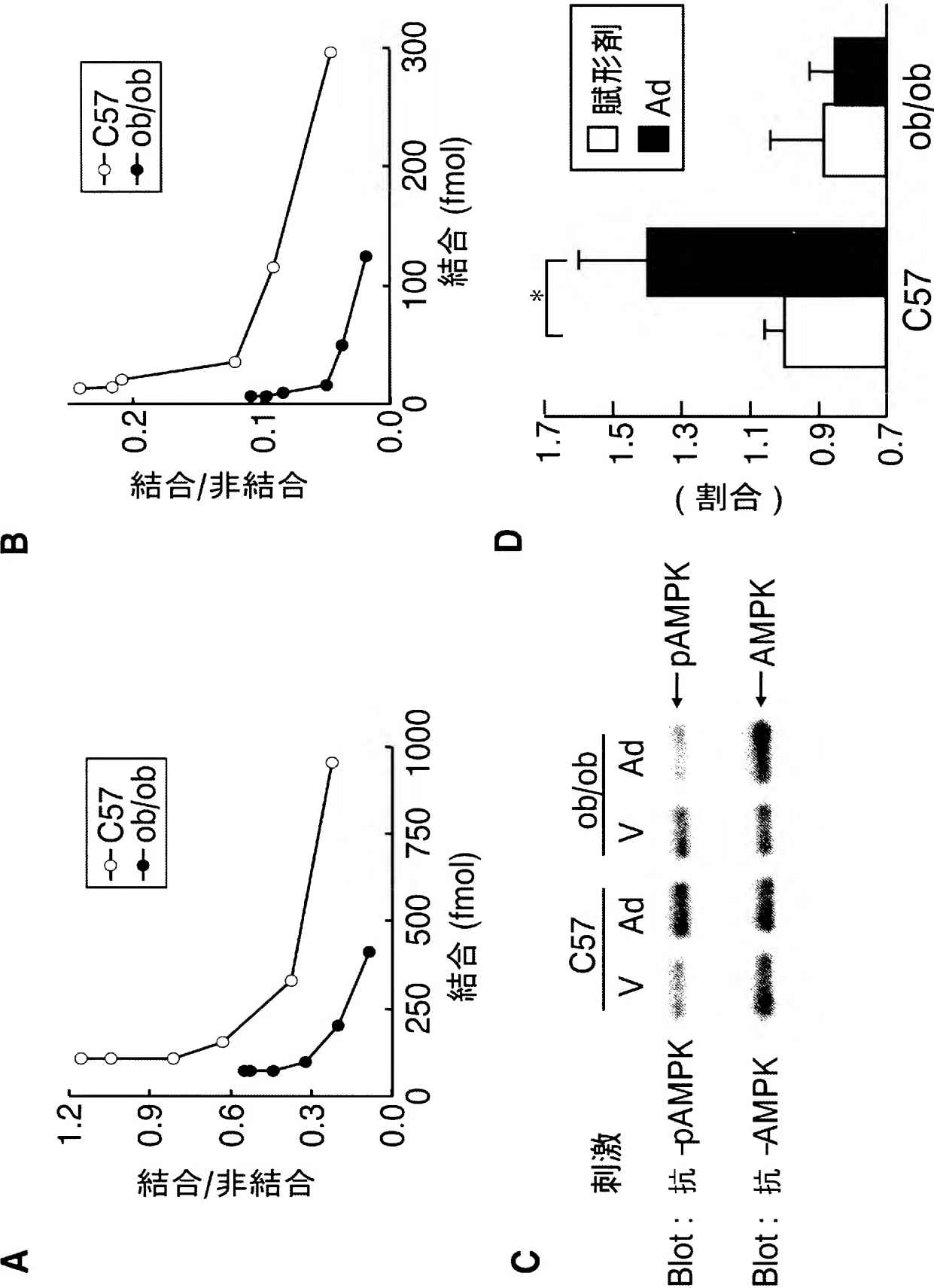
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003744

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K38/17, 48/00, 38/28, 31/4353, A61P3/04, 43/00, 3/10, 9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K38/17, 48/00, 38/28, 31/4353

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY/CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKAE, J. et al., The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression, J.Clin. Invest., 2001, Vol.108, No.9, pages 1359 to 1367	1-6
A	YAMAUCHI, T. et al., Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects, Nature, 2003, Vol.423, pages 762 to 769	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 June, 2005 (03.06.05)Date of mailing of the international search report
21 June, 2005 (21.06.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003744

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The special technical feature of the inventions according to claims 1 to 6 (hereinafter referred to as the invention group 1) resides in Foxo1 protein or Foxo1 gene, that of the inventions according to claims 7 to 14, 16 and 17 (hereinafter referred to as the invention group 2) resides in LY294002 which is a PI3 kinase inhibitor, and that of the invention according to claim 15 (hereinafter referred to as the invention group 3) resides in insulin or insulin gene.

The Foxo1 protein or Foxo1 gene, LY294002, insulin or insulin gene as described above are completely different from each other in the characteristic structural parts. Thus, it is recognized (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1 to 6.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003744

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

that there is no technical relationship among the invention groups 1 to 3 involving one or more of the same or corresponding special technical features and these invention groups are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K38/17, 48/00, 38/28, 31/4353, A61P3/04,
43/00, 3/10, 9/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K38/17, 48/00, 38/28, 31/4353

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY/CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	NAKAE, J. et al, The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression, J. Clin. Invest., 2001, Vol.108, No.9, pp.1359-1367	1-6
A	YAMAUCHI, T. et al, Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects, Nature, 2003, Vol.423, pp.762-769	1-6

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.06.2005

国際調査報告の発送日

21.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

清野 千秋

4C

3127

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-6に係る発明 (以下、発明群1とする) はFoxo1タンパク質又はFoxo1遺伝子を、請求の範囲7-14, 16, 17に係る発明 (発明群2) はPI3キナーゼ阻害剤であるLY294002を、請求の範囲15に係る発明 (発明群3) はインスリン又はインスリン遺伝子を、それぞれ特別な技術的特徴とする発明である。

上記Foxo1タンパク質又はFoxo1遺伝子、LY294002、インスリン又はインスリン遺伝子はいずれも特徴的な構造部分が全く異なるものであるから、上記発明群1-3は一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないと認められ、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているとはできない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1-6

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。